

REMARKS

The Specification

Applicants have amended the specification to correct a translation error. Specifically, applicants have replaced three occurrences of “6-aminohexane acid” with “6-aminohexanoic acid.” Support for this amendment may be found in the international application on page 8, line 28; page 11, lines 14 and 19 and, for example, on page 32, lines 4, 11, 12 and 30. Applicants have enclosed at Appendix B copies of these pages of the international application with the translated word underlined (“Aminohexansäure” corresponds to “aminohexanoic acid”). This term is correctly translated in the English specification on page 31, lines 8, 14 and 15 and on page 32, line 1 (corresponding to page 32, lines 4, 11, 12 and 30 of the international application).

Applicants also have amended the specification to insert reference at the first occurrence of 6-aminohexanoic acid (page 8, line 20) to a standard abbreviation for this compound used later in the specification (e.g., page 12, line 18). One of skill in the art would recognize that this term is a standard abbreviation for 6-aminohexanoic acid as indicated in the enclosed excerpt from the Novabiochem catalog and Lalmanach et al., Biochem. J. 318: 395-99 (1996). These documents are included in the concurrently filed Information Disclosure Statement.

The Claims

Applicants have amended claim 1, part (iii) to correct an obvious error. Specifically, the original claim recited “wherein a is H or, optionally halogen or dialkylamino substituted, C₁-C₆ alkyl, and wherein a, b and c are the same or different,

optionally halogen- or dialkylamino-substituted, C₁-C₆ alkylene; or. “ In contrast, amended claim 1, part (iii) recites “wherein a, b and c are the same or different optionally halogen- or dialkylamino-substituted, C₁-C₆ alkylene; or.” One of skill in the art would recognize that this change corrects an obvious error because the general formula I given for the compound requires that X be covalently bound to three other moieties which would be impossible if X is nitrogen and one of the substituents were hydrogen.

Applicants note that both the application as filed and the March 28, 2002 Preliminary Amendment inadvertently included a claim 15. To avoid confusion, applicants have canceled claim 15 and added claims 16 and 17 to correct this error in the numbering of the claims. Claim 16 corresponds to claim 15, as originally filed, and claim 17 corresponds to claim 15, as filed in the March 28, 2002 Preliminary Amendment.

None of these amendments adds new matter. Their entry is requested. After entry of the amendments, claims 1 – 14, 16 and 17 will be pending.

The Election/Restriction

The Examiner states that the application contains claims directed to patentably distinct species of the claimed invention. The Examiner states that claim 1 contains a generic formula for a charged copolymer wherein the generic formula encompasses a large number of distinct copolymers. The Examiner indicates that applicants are required under 35 U.S.C. § 121 to elect a single disclosed species of copolymer and to provide the name and formula of the species.

In response to the requirement, applicants elect the species where the variables in claim 1 have the following values:

R is O,O'-bis(2-aminoethyl)poly(ethylene glycol) 3400*;

W is NH;

X is 3-mercaptopropionyl-glutamic acid;

Y is NH

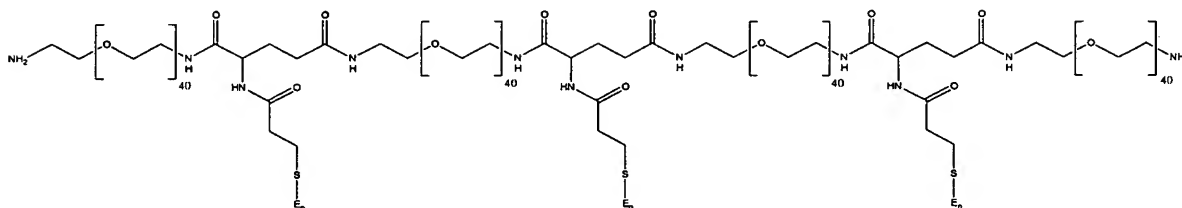
Z is omitted (m=0);

p is 3; and

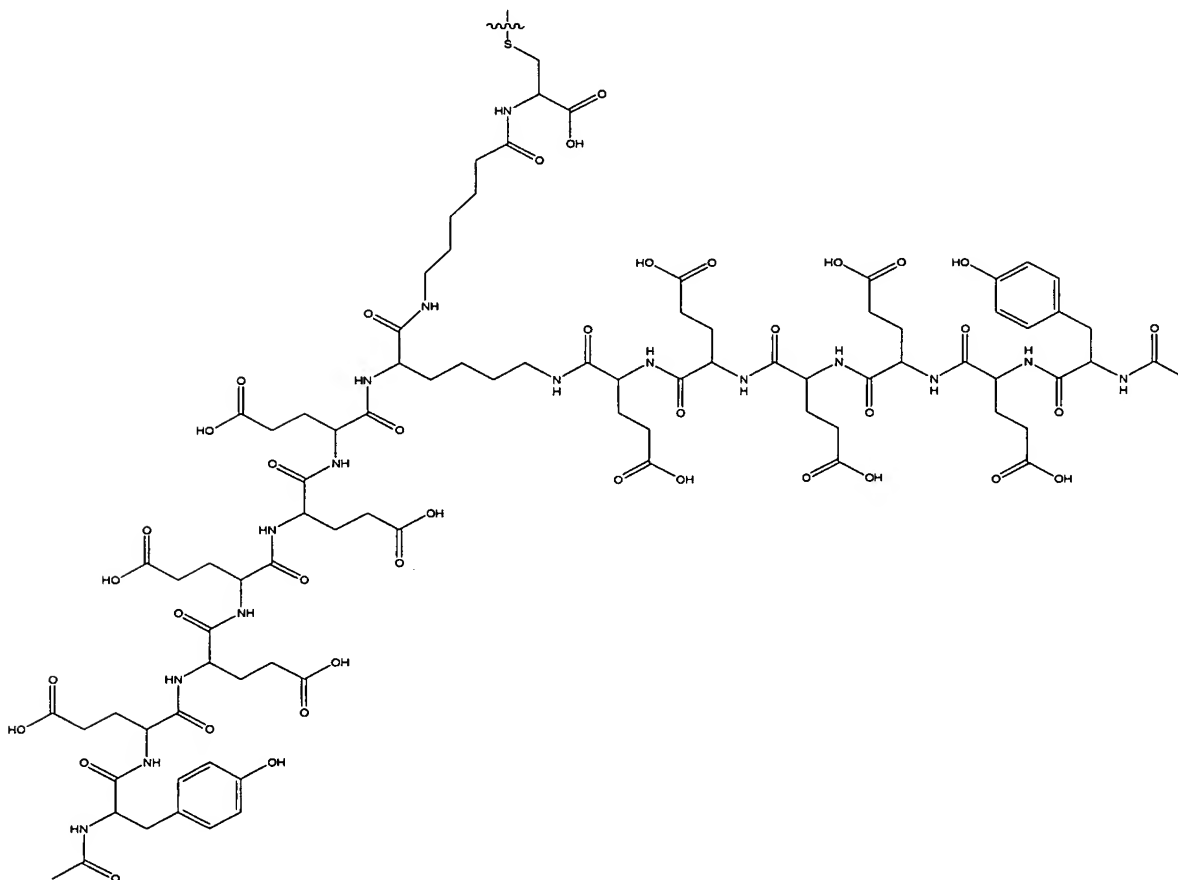
l is 1.

* Applicants note that O,O'-bis(2-aminoethyl)polyethylene glycol 3400 is composed of a mixture of sizes based on the number of repeats in the polymer (generally 40 – 500). For purposes of this election, applicants have arbitrarily specified a polymer with 40 repeats of the base unit.

Thus, the backbone for the elected species of copolymer has the following structure:



In addition, in each case, E_n has the following structure:



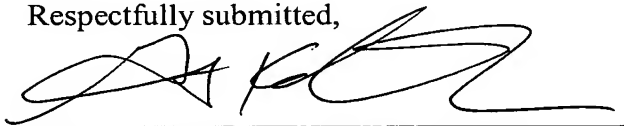
It is difficult to assign an unambiguous name to this compound, but applicants believe that the following designation would be most clear to one of skill in the art: Poly{[O,O'-bis-(2-aminoethyl)-poly(ethylene glycol)]-co-[(3-mercaptopropionyl)-glutamic acid]-graft-(Ac-Tyr-Glu₅)₂Lys-Ahx-Cys}.

Applicants election of the above-identified species is made expressly without waiver of applicants' rights to continue to prosecute and to obtain generic claims and/or to obtain claims to the non-elected species either in this application or in other applications claiming benefit herefrom.

Conclusion

Applicants request favorable consideration and early allowance of claims 1 – 14, 16, and 17.

Respectfully submitted,



James F. Haley, Jr. (Reg. No. 27,794)
Attorney for Applicants
Grant Kalinowski (Reg. No. 48,314)
Agent for Applicants

FISH & NEAVE
Customer No. 1473
1251 Avenue of the Americas
New York, New York 10020-1104
Tel.: (212) 596-9000
Fax: (212) 596-9090

Appendix A

Paragraph from page 8, lines 12 – 23 marked up to show changes made:

Suitable anionic peptide derivatives X have the general formula (peptide)_n-B-spacer-(Xaa). The peptide is a sequence of amino acids or amino acid derivatives with a negative charge altogether. Preferably, the peptide consists of three to 30 amino acids, more preferably, it consists only of glutamic acid and/or aspartic acid residues. n represents the number of branchings depending on the functional groups contained in B. B is a branching molecule, preferably lysine or a molecule of the type X in the cases ii) to iv). The spacer is a peptide consisting of 2 to 10 amino acids or an organic amino carboxylic acid having 3 to 9 carbon atoms in the carboxylic acid backbone, e.g. ~~6-aminohexane~~ 6-aminohexanoic acid ("Ahx"). The spacer serves the spatial separation of the charged effector molecule from the polymer backbone. Xaa preferably is a trifunctional amino acid, in particular glutamic acid or aspartic acid and can generally be a compound of the type X, in the cases i) to iv).

Paragraph from page 10, line 24 to page 11, line 3 marked up to show changes made:

If the polymerisation partner X is an amino acid derivative which contains a linker grouping (e.g. 3-mercaptopropionic acid, ~~6-aminohexane~~ 6-aminohexanoic acid), it can be obtained in liquid phase according to classic methods of peptide chemistry. Mercaptopropionic acid is reacted with 2,2'-dithiodipyridine and purified chromatographically. The reaction product is reacted with carboxyl-protected glutamic acid (O-t.butyl) using HOBt/EDC activation (cf. Fig. 1). ~~6-Fmoc-aminohexane~~ 6-Fmoc-aminohexanoic acid is reacted analogously. The carboxyl protecting groups are removed in TFA/DCM, the resulting glutamic acid derivative is purified using chromatographic methods.

Appendix B

Im Fall i) kann für die Synthese auch ein Aminosäurederivat verwendet werden, das zwei funktionelle Gruppen zur Copolymerisation mit dem Polymeren enthält und durch Modifikation einer Aminosäure (Glutaminsäure, Asparaginsäure, Lysin oder Ornithin) mit einer Linkergruppierung zur Ankoppelung des Effektormoleküls erhalten wurde, womit Z entfällt ($m=0$); Beispiele für Linkergruppierungen sind Pyridylthiomercaptoalkylcarboxylate (siehe Fig. 1) oder Maleimidoalkancarboxylate.

Im Fall i) kann X auch ein Peptid(derivat) sein. Im Fall eines ungeladenen Peptids oder Peptidderivats ist daran E direkt oder über Z gekoppelt.

Für den Fall, daß X ein positiv oder negativ geladenes Peptid oder Peptidderivat oder ein Spermin- oder Spermidinderivat ist, stellt X selbst das Effektormolekül dar (Z und E entfallen, $m=n=0$). Im einfachsten Fall besteht das Peptid in diesem Fall aus einer linearen Abfolge aus zwei oder mehreren identischen oder verschiedenen natürlichen oder synthetischen Aminosäuren, wobei die Aminosäuren so gewählt werden, daß das Peptid insgesamt entweder positiv oder negativ geladen ist. Alternativ kann das Peptid verzweigt sein. In diesen Fällen stellt das Peptid als solches den Effektor dar, Z und E entfallen ($m = n = 0$). Beispiele für einen Typ geeigneter verzweigter kationischer Peptide wurden von Plank et al., 1999, beschrieben.

Geeignete anionische Peptidderivate X weisen die allgemeine Formel (Peptid)_n-B-Spacer-(Xaa) auf. Das Peptid ist eine Abfolge von Aminosäuren oder Aminosäurederivaten mit insgesamt negativer Ladung. Bevorzugt besteht das Peptid aus drei bis 30 Aminosäuren, vorzugsweise besteht es ausschließlich aus Glutaminsäure- und/oder Asparaginsäureresten. n stellt die Anzahl der Verzweigungen in Abhängigkeit der in B enthaltenen funktionellen Gruppen dar. B ist ein Verzweigungsmolekül, vorzugsweise Lysin oder ein Molekül des Typs X im Fall von ii) bis iv). Der Spacer ist ein Peptid, bestehend aus 2 bis 10 Aminosäuren oder eine organische Aminocarbonsäure mit 3 bis 9 Kohlenstoffatomen im Carbonsäurerüst, z.B. 6-Aminohexansäure. Der Spacer dient zur räumlichen Trennung des geladenen Effektormoleküls vom Polymergerüst. Xaa ist bevorzugt eine trifunktionelle Aminosäure, insbesondere Glutaminsäure oder Asparaginsäure und kann im allgemeinen eine Verbindung des Typs X, Fall i) – iv) sein.

Für die Verzweigungsstelle B des Moleküls (Peptid)_n-B-Spacer-(Xaa) oder (Peptid)_n-B-Spacer-(Xbb) kommt Fmoc-K(Fmoc)-OH zum Einsatz. Die Peptide werden mit TFA/DCM vom Harz gespalten.

- 5 Wenn der Polymerisationspartner X ein Peptid der allgemeinen Struktur (Peptid)_n-B-Spacer-(Xaa) in der nachfolgenden Copolymerisation ist, so wird an der Position Xaa Glutaminsäure oder Asparaginsäure verwendet, die an einer Carboxyl-Position mit einer Benzylschutzgruppe versehen ist. Diese wird selektiv durch Hydrogenolyse (Felix et al., 1978) entfernt. Die N-terminal gelegenen Aminosäurepositionen der Peptidkette werden
10 mit Boc-geschützten Aminosäuren belegt, um die Schutzgruppenabspaltung nach Copolymerisation des Peptids mit PEG in einem Schritt durchführen zu können.

Ist der Polymerisationspartner X ein Aminosäurederivat, das eine Linkergruppierung enthält (z.B. 3-Mercaptopropionsäure, 6-Aminohexansäure), so kann dieses in
15 Flüssigphase nach klassischen Methoden der Peptidchemie erhalten werden. Mercaptopropionsäure wird mit 2,2'-Dithiodipyridin umgesetzt und chromatographisch gereinigt. Das Reaktionsprodukt wird mit Carboxyl-geschützter Glutaminsäure (O-t-butyl) unter HOBt/EDC-Aktivierung umgesetzt (siehe Fig. 1). Analog wird 6-Fmoc-Aminohexansäure umgesetzt. Die Carboxylschutzgruppen werden in TFA/DCM
20 entfernt, das resultierende Glutaminsäurederivat wird mittels chromatographischer Methoden gereinigt.

Die Herstellung der Copolymeren ist nach folgenden Prinzipien möglich und wird anhand eines PEG-Peptid-Copolymeren veranschaulicht:

25

(1) poly(PEG -O- OC-) Matrix („Polyester“):

Die Copolymerisation der ionischen, partiell seitenkettengeschützten Peptid-Dicarbonsäuren bzw. Glutamin- oder Asparaginsäurederivate mit PEG-Macromonomeren in definierten Molmassenbereichen (MW 400-20000 in Handel
30 erhältlich, z.B. Fluka) liefert eine Matrix auf PEG-Esterbasis. Diese stellt ein in physiologischer Umgebung hydrolyselabiles System dar (Ulbrich et al., 1985).

W=Y=NH; X=Fmoc-6-Aminohexanoyl-glutaminsäure.

Das heißt, X ist gemäß i) ein Aminosäurederivat, das durch Ankoppelung von Fmoc-6-Aminohexansäure an Glutaminsäure erhalten wurde. Für die Ankoppelung des Effektormoleküls E kann Z entfallen oder ein bifunktionaler Linker wie SPDP oder EMCS sein.

Ein zur Ankoppelung an dieses Polymergerüst geeigneter Effektor E kann ein Peptid des Typs E4E^{PROT} (Z entfällt) oder des Typs YE5C sein, wobei dieses über das Cystein-Thiol mit dem Linkermolekül Z (z.B. SPDP oder EMCS) reagiert.

a) Synthese des Dipeptids Fmoc-6-Aminohexansäure-GluOH (6):

1 g Fmoc-geschützte 6-Aminohexansäure (2.82 mmol), 1.2 eq. Glu(OtBu)OtBu und 1.2 eq. 1-Hydroxybenzotriazol werden in 200 ml Dichlormethan gelöst. Die Mischung wurde nach Kühlen auf 0°C mit 1.2 eq. N-Ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)-carbodiimid und 1.7 ml Diisopropylethylamin versetzt (pH = 8). Nach einer Stunde bei 0°C wurde noch 18 Std bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde nun vollständig abdestilliert, der Rückstand mit Ethylacetat aufgenommen und mit 0.5 N Salzsäure, gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und gesättigter Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Nach Abziehen des Lösungsmittels wurde Fmoc-6-Aminohexansäure-Glu(OtBu)OtBu (5) nach Gefriertrocknung erhalten.

Di-t-butyl-geschütztes Derivat (5) wurde in 30 ml Dichlormethan/Trifluoressigsäure 2:1 gelöst und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Nach vollständiger Reaktion (Reaktionskontrolle mit reversed phase-HPLC) wurde das Lösungsmittel auf ca. 5% des Ausgangsvolumen reduziert und das Produkt (6) durch Präzipitation aus Diethylether erhalten. Abschließende Reinigung erfolgte durch RP-HPLC mit einem Acetonitril/ Wasser/ 0.1%TFA Gradienten.

b) Copolymerisation von Fmoc-6-Aminohexansäure-GluOH (6) mit O,O'-Bis(2-aminoethyl)poly(ethylenglykol) 3400' (Diamino-PEG-3400, Fluka), Produkt (7): 10 mg (6), 1.5 eq. O,O'-Bis(2-aminoethyl)poly(ethylenglykol) 3400', 2 eq. Dicyclohexylcarbodiimid und 0.25 eq. 4-(Dimethylamino)-pyridin werden in 5 ml